

Ist die getrennte Bestimmung des Serumbilirubins
in eine direkt und in eine indirekt reagierende
Fraktion im klinischen Routinebetrieb von
differentialdiagnostischer Bedeutung?

Andreas Presch

Diss
München
1985

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der
Universität München
Direktor: Prof. Dr. Buchborn

Ist die getrennte Bestimmung des Serumbilirubins
in eine direkt und in eine indirekt reagierende
Fraktion im klinischen Routinebetrieb von
differentialdiagnostischer Bedeutung?

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Andreas Presch
aus
Bad Steben
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter :Prof.Dr.Horn
Mitberichterstatter :Prof.Dr.Buchborn
Dekan :Prof.Dr.Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

05. Juni 1985

Herrn Prof.Dr.Müller-Lissner sei an erster Stelle herzlichst gedankt für seine stete Bereitschaft , seine Geduld und seine große Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr.König sowie Frau E.Beranek danke ich für die Unterstützung bei der rechnerischen Auswertung dieser Arbeit.

Eine große Hilfe war mir das stets freundliche Interesse von Prof.Dr.K.Horn.

Teile der Arbeit wurden publiziert (Dtsche Med Wschr 1984,15 : 576-580.

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern,Dr.med.Hans-Rudolf und Renate Presch,für deren immerwährende Förderung im beruflichen wie im privaten Bereich ich zutiefst dankbar bin,sowie meiner Freundin Claudia Sackermann,mit der ich einen großen Teil des Studiums zusammen verbracht habe.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	Seite 1-2
Methodik	Seite 3-13
Ergebnisse	Seite 14-19
Diskussion	Seite 20-26
Zusammenfassung.....	Seite 27
Literatur	Seite 28-31
Lebenslauf	Seite 32

1. Einleitung

Das Bilirubin, das im Körper normalerweise täglich in einer Menge von etwa 250 mg anfällt, ist hauptsächlich das Abbauprodukt des Blutfarbstoffes Hämoglobin. Zu über 80 % entsteht das Bilirubin aus dem Abbau der Erythrocyten. Der Rest entsteht aus Nicht-Hämoglobin-Porphyrinproteinen (Cytochromen, katalasen, Peroxidasen) sowie frühzeitigem Abbau unfertiger Hämoglobinformen im Knochenmark (sog. "shunt-bilirubin"). Das Häm wird nach Ringöffnung über das Biliverdin in das Bilirubin umgewandelt und an Albumin gebunden an die Leberzelle transportiert, in der es mit zwei Molekülen Glucuronsäure gekoppelt wird. So wasserlöslich gemacht, wird das Bilirubin-diglucuronid aktiv in die Gallengänge ausgeschieden und weiter über verschiedene Zwischenstufen (Mesobilirubin, Urobilinogen, Stercobilinogen) mit dem Stuhl ausgeschieden. Ein kleiner Teil wird vorher rückresorbiert, erscheint wieder im Blut und nimmt am entero-hepatischen Kreislauf teil.

Das wasserunlösliche, an Albumin gebundene Bilirubin und das wasserlösliche, diglucuronisierte Bilirubin können quantitativ bestimmt werden (z.B. mit HPLC = High Performance Liquid Chromatography). In der klinischen Routinediagnostik wird versucht, diese Fraktionen einfacher zu bestimmen. Dies geschieht z.B. bei der Jendrassik-Grof-Methode (22) mit Hilfe eines Akzelerators, dessen Verwendung das indirekte Bilirubin bestimmen hilft, welches dem Albumin gebundenen Bilirubin entsprechen soll. Ohne Akzelerator hingegen wird das direkte Bilirubin bestimmt, das dem Glucuronsäure gekoppelten Bilirubin weitgehend entsprechen soll (24). Die getrennte Bestimmung der beiden Fraktionen wurde erstmals von Hymans van den Bergh und Müller (4) durchgeführt und ist seit vielen Jahrzehnten in der klinisch-chemischen Routinediagnostik in Gebrauch.

Steigt das Bilirubin im Blut an, so wird es ab etwa 2 mg/dl beim Menschen sichtbar, zuerst in den Skleren (Gelbsucht, Ikterus). Verschiedene Ursachen des Ikterus sollen nun aufgrund unterschiedlicher Anteile des direkten am Gesamtbilirubin unterschieden werden können; Bei Patienten mit hämolytischem Ikterus soll der Anteil des direkten Bilirubins niedrig, bei Patienten mit Ikterus hepato biliärer Genese dagegen hoch sein (1, 12, 14, 20, 24, 42). Studien, in denen gezeigt wird, daß sich verschiedene Patientengruppen hinsichtlich des Anteils des direkten am Gesamtbilirubin tatsächlich unterscheiden, sind allerdings spärlich (41, 43). Außerdem gibt es Hinweise, daß die Bilirubinfraktionierung keineswegs zuverlässig ist und bei geringfügigen methodischen Variationen erheblich unterschiedliche Resultate ergibt (23). Auch ist nicht klar, ob und inwieweit die üblichen Assays auch andere Kopplungsprodukte als die an Glucuronsäure gekoppelten erfassen (26).

Die vorliegende retrospektive Studie geht der Frage nach, ob in einem Kliniklabor die Trennung des Serum-bilirubins in eine direkte und in eine indirekte Fraktion Werte ergibt, aufgrund derer im individuellen Falle auf die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Diagnosegruppe geschlossen werden darf.

2. Methodik

2.1. Methode der Gesamtbilirubin-Bestimmung (B_G)

2.1.1. Varianten

Es ergaben sich im Laufe der letzten Jahrzehnte verschiedene Varianten der Bilirubinbestimmung, so die DPD-, Jendrassik-Grof- und die Evelyn-Malloy-Methode. Da die DPD-Methode mit ihren Kit-Chemikalien am wenigsten instabil und damit am leichtesten mechanisierbar ist, wurde sie auch in diesem Fall bei der automatisierten Gesamtbilirubinbestimmung mit dem Hitachi 705 Analysenautomaten verwendet (40).

2.1.2. Testprinzip

Probe : Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma
Reagenz 1 : HCl 100 mmol/l, Detergenz
Reagenz 2 : 2,5-Dichlor-phenyl-diazoniumsalz 2 mmol/l
HCl 200 mmol/l, Detergenz

Die Serumprobe (10 μ l) wird mit dem Akzelerator (350 μ l von Reagenz 1) versetzt, um das Bilirubin aus der Eiweißbindung zu lösen. Nach 5 min Reaktionszeit wird die Extinktion des Probenleerwertes gemessen. Nach Zugabe der Diazoniumverbindung (hier: 350 μ l von Reagenz 2) wird das gesamte Bilirubin zu dem entsprechenden Azo-Bilirubin gekoppelt, das als Endpunktmessung nach weiteren 5 min Reaktionszeit bei 546 nm photometrisch bestimmt wird. Die Extinktionsdifferenz zwischen Endpunktmessung und Probenleerwert ist der Bilirubinkonzentration proportional.

2.1.3. Störfaktoren

2.1.3.1. Licht (UV-, Tageslicht) zersetzt Bilirubin. Es setzt das Molekulargerüst des Bilirubins in Schwingung, so daß es "umklappt", die sterische Konfiguration und damit die Kopplungsreaktion mit Diazoreagenz verändert.

2.1.3.2. Hämolyse, vor, während und nach Probenentnahme verfälscht die Probe, da freier Hämoglobin (ab 40 mg/dl) mit den bei der Bilirubinmessung entstehenden Farbstoffen interferiert. Es ergeben sich zu niedrige Werte.

2.1.3.3. Seren von urämischen, hämodialysierten und nierentransplantierten Patienten ergeben falsch hohe Werte. Dies soll durch reaktive Vorgänge zwischen DPD und Metaboliten im Blut solcher Patienten geschehen, wobei man nur weiß, daß es sich nicht um Kreatinin oder Harnstoff handelt. Daten solcher Patienten fanden daher in diese Studie keinen Eingang.

Da die Bestimmung des direkten Bilirubins mit der DPD-Methode nicht möglich ist, wurde hierfür die manuelle Methode nach Jendrassik-Groß (22) angewandt. Dies geschieht in der Medizinischen Klinik Innenstadt bisher routinemäßig bei einem Gesamtbilirubin $\geq 1,5$ mg/dl.

2.2. Bestimmung des direkten Bilirubins

2.2.1. Varianten: siehe unter 2.1.1.

2.2.2. Testprinzip

Probe : Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma

Lösung 1 : Sulfanilsäure 29 mmol/l

HCl 170 mmol/l

Lösung 2 : Natriumnitrit 25 mmol/l

Zuerst wird der Probenleerwert (0,2 ml Probe/2,0 ml NaCl 0,9% / 0,2 ml Lösung 1) bei 546 nm photometrisch gemessen. Nach der Messung wird die Probe mit obigen Reagenzien plus zusätzlich 0,05 ml Lösung 2 versetzt. Nach weiteren 5 min erfolgt die Endpunktmessung gegen den Probenleerwert. Die Serumprobe wird also ohne Akzelerator mit diazotierter Sulfanilsäure zu einem Azofarbstoff gekoppelt. Der Testkit wird von der Firma Boehringer Mannheim unter der Bestellnummer 717-720 angeboten.

2.2.3. Störfaktoren

Es handelt sich um dieselben wie unter 2.1.3. beschrieben.

2.3. Qualitätskontrolle

2.3.1. Reproduzierbarkeit der Gesamtbilirubinbestimmung:

2.3.1.1. Die Präzision von Tag zu Tag wurde durch Kalibrierung der Methode mit Richtigkeitsseum "Precibil" der Firma Boehringer zur Eichung und anschließender täglicher Qualitätskontrolle mit einem Kontrollserum (Großhadern II) mit pathologischem Bilirubingehalt durchgeführt.

2.3.1.2. Die Seren von drei Patienten mit erhöhtem Serum-bilirubin unterschiedlicher Genese (Hämolyse, Cirrhose, Stauungsleber) wurde jeweils fünfmal fraktioniert eingefroren und im Dunkeln bei -20°C aufbewahrt. Von jedem der Seren wurde an fünf verschiedenen Tagen eine Fraktion aufgetaut und zur Bilirubinbestimmung ins Labor gegeben. Auf die Zeit zwischen dem Auftauen und der Bestimmung im Labor wurde kein Einfluss genommen, da auch im klinischen Routinebetrieb unterschiedliche Zeiträume zu erwarten sind.

2.3.2. Reproduzierbarkeit der Bestimmung des direkten Bilirubins:

Die im vorherigen Absatz geschilderten eingefrorenen Proben wurden unter denselben Bedingungen auch zur Bestimmung des direkten Bilirubins ins Labor gegeben.

2.3.3. Untersuchung der Spezifität der Bestimmungsmethode an Hand von T-Drain-Galle:

Frische T-Drain-Galle wurde in unterschiedlichen Verdünnungen zur fraktionierten Bilirubinbestimmung ins Labor gegeben. Da Galle nur konjugiertes Bilirubin enthält (43), sollte das in ihr enthaltene Bilirubin vollständig direkt reagieren.

2.4. Einteilung der Patientenkollektive:

Es wurden alle Patienten ermittelt, die während eines stationären Aufenthaltes in der Medizinischen Klinik Innenstadt zwischen dem 01.07.81 und dem 30.06.82 ein Gesamtbilirubin von $1,5 \text{ mg\%}$ hatten. Es ergaben sich 205 Patienten. An Hand ihrer Krankenakten wurde analysiert, welche Erkrankung zur Bilirubinerrhöhung geführt hatte. Patienten, bei denen eine Diagnose nicht eindeutig gestellt werden konnte, wurden ausgeschlossen, ebenso Patienten mit mehreren potentiell ikterisch verlaufenden Krankheiten (z.B. Malaria mit bekannter Gallensteinerkrankung). Insbesondere nicht ausgewertet wurden Patienten mit Lebererkrankungen, die Bluttransfusionen erhalten hatten, sowie Patienten mit Hämolyse, die erhöhte Transaminasen oder Cholestasezeichen hatten.

Als Laborzeichen für Cholestase galt die Erhöhung der alkalischen Phosphatase, für Lebererkrankungen die der Transaminasen (GOT, GPT, Gamma-GT). Hämolyse wurde an Hand von laborchemischen (freies Hämoglobin, Haptoglobin, LDH) oder klinischer Daten diagnostiziert.

Da in diese Studie keine Patienten mit Ikterus unklarer Genese aufgenommen wurden, finden sich auch keine Patienten mit sog. "konstitutioneller" Hyperbilirubinämie wie z.B. Gilbert-Meulengracht Syndrom, zumal solche Diagnosen oft Ausschlussdiagnosen sind. Es verblieben nach Auswertung der Unterlagen folgende Gruppen:

- a. 21 Patienten mit akuter Hepatitis
(5 Hepatitis A, 8 Hepatitis B, 7 Hepatitis non-AB,
1 Hepatitis bei Mononukleose)
- b. 8 Patienten mit kardialer Stauungsleber
- c. 25 Patienten mit Lebercirrhose
(21 sicher, 3 wahrscheinlich alkoholisch bedingt,
1 mit unklarer, wahrscheinlich nicht alkoholischer
Genese)
- d. 18 Patienten mit extrahepatischem Verschlußikterus
(10 durch Gallensteine, 8 durch Tumoren der extra-
hepatischen Gallenwege bedingt)
- e. 20 Patienten mit Hämolyse
(5 bei Leukosen, 2 autoimmunhämolytisch, 3 bei
Malaria, 2 nach Herzklappenersatz, 2 nach Einsatz
der Herz-Lungen-Maschine, 1 bei Moschkowitz-Syndrom,
1 nach Weichteilblutung bei Hämophilie A, 1 post-
operativ bei unklarer Genese, 1 bei Marchiafava-
Micheli-Syndrom, 1 bei Baypen^R -bedingter Hämolyse,

2.5. Statistische Verfahren

2.5.1. Mit der linearen Regressionsanalyse (32) wurde die Relation zwischen Gesamtbilirubin und direktem Bilirubin in den fünf Patientengruppen untersucht.

2.5.2. Mit "Student's t-Test" (21) wurden die Quotienten aus direktem und Gesamtbilirubin der Hämolysegruppe mit dem Quotienten der vier anderen Gruppen verglichen.

2.5.3. Mit der "receiver operating characteristic curve" (ROC-Kurve) wird ermittelt, welcher Grenzwert eines bestimmten Parameters zwei Gruppen am besten trennt und wie hoch dann Sensitivität und Spezifität des Tests sind (2,27,28). In Tabelle 1 wird die Konstruktion der Kurve gezeigt. Man ordnet die Werte der Größe nach und betrachtet sie dann sukzessive als den Grenzwert, der der Entscheidung zugrunde gelegt wird, welche Werte von $B_{D/G}$ zur Diagnose Hämolyse führen ($\geq$ Grenzwert) und welche zur Diagnose hepatobiliäre Erkrankung führen ($<$ Grenzwert). So errechnet man aus der richtig erfassten Anzahl der Werte der einen Gruppe im Verhältnis zur Gesamtzahl der Werte derselben Gruppe den Prozentsatz der richtig-positiv (Sensitivität) und der richtig-negativ (Spezifität) erfassten Werte. Sensitivität und Spezifität gegeneinander aufgetragen ergeben den Rahmen für die ROC-Kurve, wobei sich die richtig-positiven Resultate der einen Gruppe mit den falsch-positiven Resultaten der anderen Gruppe zu 100 % ergänzen. Je stärker die Kurve gekrümmt ist, desto besser ist der diagnostische Test. Aus der Anzahl der einen Gruppe geteilt durch die Anzahl der Werte der anderen Gruppe erhält man die Steigung einer Tangente, deren Berührungspunkt mit der Kurve den optimalen Grenzwert ergibt, d.h. jenen Punkt, bei dem die Trennung der zwei Gruppen am klarsten ausfällt.

Tabelle 1: Schematische Darstellung der Konstruktion einer ROC-Kurve.

Fall	$B_{D/G}$	Hämolyse	RP-Hämolyse	FP-Hämolyse
1	1.00	-	20/20=100%	71/72=98,6%
2	0,93	-	.	70/72=97,2%
3	0,89	-	.	.
4	0,89	-	.	68/72=94,4%
5	0,88	+	19/20=95,1%	.
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
17	0,76	+	18/20=90,0%	.
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
92	0,125	-	0/20= 0%	0/72= 0%

3. Ergebnisse

3.1. Präzision der Gesamtbilirubin-Bestimmung

Das Kontrollserum zeigte bei 40 Messungen innerhalb zweier Monate im Mittel eine Bilirubinkonzentration von 4,93 mg/dl mit einem Variationskoeffizienten von 7,8 %.

3.1.2. Präzision der Bestimmung des direkten Bilirubins

Die Ergebnisse aus der wiederholten Bestimmung dreier Patientenserum sind in Tabelle 2 dargestellt. Es zeigt sich, daß unabhängig von der absoluten Höhe des Bilirubinspiegels die Reproduzierbarkeit der Bestimmung sowohl des gesamten wie auch des direkten Bilirubins gut ist.

3.1.3. Spezifität der Messung von T-Drain-Galle

Das in der T-Drain-Galle vorhandene Bilirubin wurde unabhängig von der Verdünnung zu 91-102 % und damit praktisch vollständig als direktes Bilirubin gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

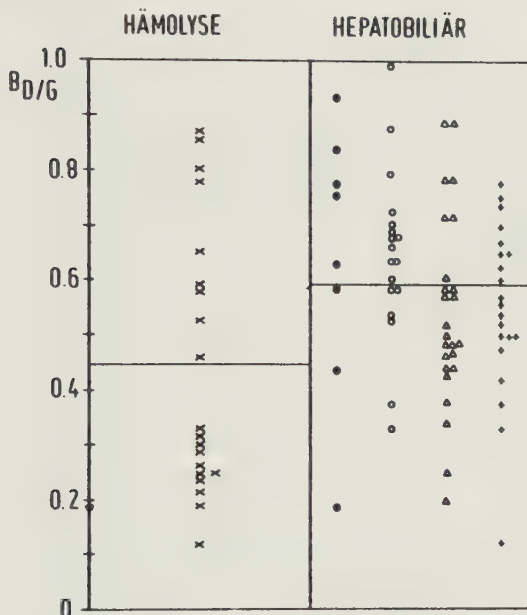
Tabelle 2

Ergebnisse der wiederholten Messungen dreier verschiedener Patientenserien (I, II, III).

Messung	Gesamtes Bilirubin (mg%)			direktes Bilirubin (mg%)			direktes/gesamtes Bilirubin (Σ_D/Σ)		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	1,9	33,4	2,4	1,0	16,3	1,2	0,526	0,499	0,500
2	1,8	32,9	2,3	0,9	16,4	1,2	0,500	0,498	0,522
3	1,7	30,5	2,5	0,7	16,6	1,2	0,412	0,544	0,522
4	1,7	31,8	2,4	1,0	15,5	1,2	0,588	0,487	0,500
5	1,9	32,1	2,4	0,9	15,7	1,2	0,474	0,489	0,500
Mittelwert	1,8	32,1	2,4	0,9	16,1	1,2	0,500	0,501	0,509
Standardabweichung	0,1	1,1	0,1	0,1	0,5	0,0	0,065	0,024	0,011
Variationskoeffizient	5,56	3,47	2,32	13,60	2,95	0,00	13,02	4,79	2,16

Verdünnung	Gesamt-Bil. (mg%)	Dir. Bil. (mg%)	Dir./Gesamtbil.
1 : 6	7.90	7.95	1.01
1 : 11	4.60	4.25	0.92
1 : 21	2.20	2.00	0.91

Abbildung 1



Legende zu Abbildung 1:

Bilirubinquotienten $B_{D/G}$ der Patienten, deren Bilirubin-
erhöhung durch Hämolyse (x), durch kardiale Stauungs-
leber (●), durch extrahepatischen Verschuß (○), durch
Lebercirrhose (△) bzw. durch akute Hepatitis (+) bedingt
war. Die Querstriche geben die Mittelwerte an. Da sich die
vier Gruppen mit hepatobiliärem Ikterus untereinander
nicht unterscheiden, wurde ein gemeinsamer Mittelwert er-
rechnet. Der Unterschied zwischen den eingezeichneten
Mittelwerten ist statistisch signifikant, $p < 0,01$.

3.2. Ergebnisse der Untersuchung der Patientendaten

3.2.1. Vergleich der Hämolyse- und der hepatobiliären Gruppe hinsichtlich ihres Bilirubinquotienten:

Die in Tabelle 4 wiedergegebenen Mittelwerte und Standardabweichung des Quotienten $B_{D/G}$ (=Verhältnis direktes zum Gesamtbilirubin) sowie die Werte der linearen Regressionsanalyse zeigen, daß die Patientengruppe mit Ikterus hepatobiliärer Genese einen Bilirubinquotienten hat, der mit $0,584 \pm 0,178$ SD signifikant größer ist als der der Patienten - gruppe mit Hämolyse mit $0,445 \pm 0,242$ SD ($p < 0,01$). Die hepatobiliäre Gruppe hatte also einen signifikant höheren Anteil des direkten am Gesamtbilirubin als die Hämolysegruppe. Die hepatobiliären Krankheiten wurden gepoolt, da sich zeigte, daß sich zwischen diesen keine signifikanten Unterschiede ergaben. Wie man in Abbildung 1 sehen kann, ist jedoch die Überlappung zwischen der Hämolyse- und der hepatobiliären Gruppe beträchtlich, so daß die Kenntnis des Quotienten im individuellen Fall keine eindeutige Klassifizierung in eine der beiden Gruppen erlaubt.

3.2.2. Zuordnungsmöglichkeit zur Hämolyse- oder hepatobiliären Gruppe mittels der ROC-Kurve:

Die Güte der Trennung zwischen den beiden Ikterus - gruppen durch die Bilirubinfraktionierung läßt sich aus der in Abbildung 2 dargestellten ROC-Kurve ablesen. Die maximale Unterscheidungsmöglichkeit wird erreicht, wenn ein Bilirubinquotient von 0,33 der Entscheidung zugrunde gelegt wird, ob ein Patient der einen oder anderen Gruppe zugeordnet wird. In diesem Fall werden 91 % der Fälle der hepatobiliären Gruppe richtig klassifiziert, 9 % zu Unrecht als hämolytisch betrachtet.

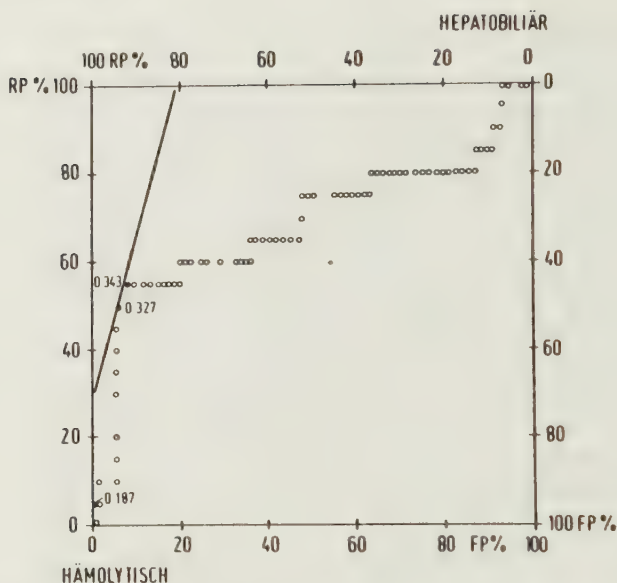
Tabelle 4.

Mittelwerte und Standardabweichungen der Quotienten B_D/G und Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse zwischen direktem und gesamtem Bilirubin.

Diagnose	B_D/G	SD	r*	a*	b*
akute Hepatitis	0,554	0,157	0,989	-0,463	0,658
Zirrhose	0,554	0,177	0,961	-0,491	0,679
Stauungsleber	0,644	0,241	0,965	-0,947	1,015
extrahepat. Verschlüß	0,648	0,159	0,955	-0,110	0,684
Hämolyse	0,445	0,242	0,918	-1,180	0,842

*) r = Korrelationskoeffizient, a = Achsenabschnitt, b = Regressionskoeffizient.
Alle Korrelationen sind signifikant ($p < 0,001$).

Abbildung 2



Legende zu Abbildung 2:

ROC-Kurve zur Ermittlung des optimalen Grenzwertes des Quotienten $B_{p/G}$ für das Maximum an Trennschärfe zwischen hepatobiliärer und hämolytischer Bilirubin-erhöhung. RP = richtig-positiv, FP = falsch-positiv. Jeder Punkt der Kurve gibt den bei einem bestimmten Grenzwert erhaltenen Prozentsatz richtig-positiver bzw. falsch-positiver Resultate wieder. Einige der Grenzwerte sind geschwärzt und mit ihrem numerischen Wert versehen. Da jeder Patient genau einer der Gruppen "hepatobiliär" oder "hämolytisch" zugehört, sind die Skalen für falsch-positive und richtig-positive Befunde jeweils gegenläufig. Die Tangente hat die Steigung, die gleich ist dem Quotienten aus Anzahl der Patienten mit hepatobiliärem und hämolytischem Ikterus. Der ermittelte optimale Grenzwert liegt bei 0,33.

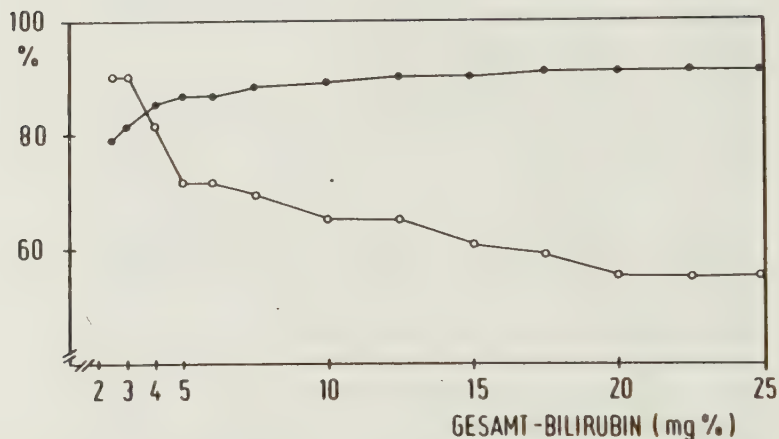
Die Hämolysepatienten werden nur zu 55 % richtig - positiv erfasst, 45 % werden zu Unrecht der hepatobiliären Gruppe zugeschlagen.

Insgesamt werden von der Hämolysegruppe 11 von 20, in der hepatobiliären Gruppe 65 von 72 Patienten richtig erkannt. Das entspricht einer Trefferquote von 84 % richtig-positiven Resultaten.

Da große Mengen an nicht konjugiertem Bilirubin durch Überschreiten der Exkretionskapazität der Leber zur Erhöhung des konjugierten Bilirubins im Serum führen (11,16), ist eine Verbesserung der Trennfähigkeit der Fraktionierung zu erwarten, wenn hohe Gesamtbilirubinwerte von der Analyse ausgeschlossen werden. Sukzessive Reduktion des maximalen Gesamtbilirubinwertes führte zu zunehmender Verbesserung der Sensitivität für Hämolyse. Als bester Trennpunkt wurde ein B_G von 3 mg% ermittelt. Dies ist in Abbildung 3 ersichtlich. Eine zweite ROC-Kurve, bei der sich die Analyse auf die 38 Patienten mit einem Gesamtbilirubin von höchstens 3 mg% beschränkt, ist in Abbildung 4 gezeigt. 28 dieser 38 Patienten waren aus der hepatobiliären, 10 von 38 aus der Hämolysegruppe.

Jetzt wurden 80 % der hämolytischen und 86 % der hepatobiliär bedingten Ikterusfälle richtig klassifiziert, wobei der optimale Grenzwert wieder bei 0,33 lag. Insgesamt wurden 32 von 38 Patienten, d.h. wieder 84 % der Fälle korrekt eingestuft.

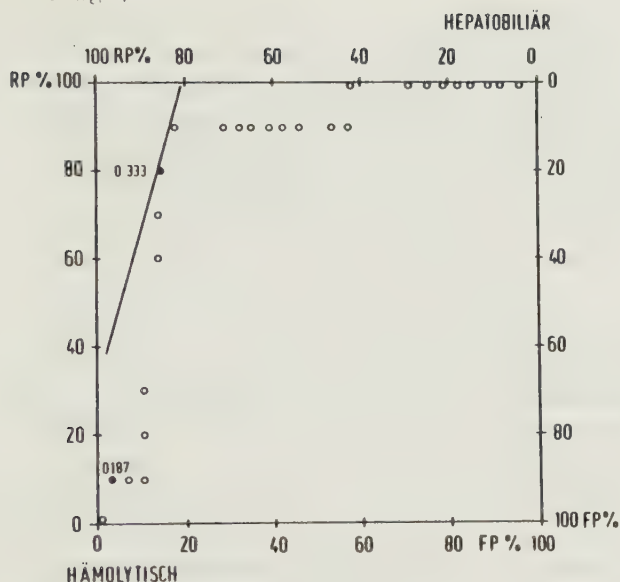
Abbildung 3



Legende zu Abbildung 3:

Die Abbildung zeigt die aufgrund von ROC-Kurven ermittelte maximale Sensitivität für hämolytisch (o) oder hepato-biliär (•) bedingte Hyperbilirubinämie in Abhängigkeit der maximalen Höhe der in die Analyse einbezogenen Gesamtbilirubinwerte. Werden Patienten mit hohem Gesamtbilirubin ausgeschlossen, so steigt die Sensitivität beträchtlich.

Abbildung 4



Legende zu Abbildung 4:

ROC-Kurve der Patienten mit einem Gesamtbilirubin von maximal 3,0 mg%. Der optimale Grenzwert bleibt ähnlich dem der ROC-Kurve ohne Bilirubinbegrenzung, die Sensitivität für Hämolyse wird jedoch entscheidend besser, die für hepatobiliäre Bilirubinerhöhung etwas schlechter.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Fraktionierung des Serumbilirubins in einem klinisch-chemischen Routinelabor Patienten mit Hyperbilirubinämie hepatobiliärer von solchen mit Hyperbilirubinämien hämolytischer Genese gut genug zu trennen vermag, um eine differentialdiagnostische Hilfe darzustellen.

Dazu wurden die Daten der während eines Jahres stationär aufgenommenen Patienten analysiert, bei denen ein erhöhtes Serumbilirubin eindeutig auf nur eine Ursache zurückzuführen war. Die Zuverlässigkeit der verwendeten Meßmethoden wurde durch mehrere Validationsstudien sichergestellt.

Patienten mit hepatobiliärem Ikterus unterschiedlicher Ätiologie hatten ähnliche Anteile des direkten am Gesamtbilirubin. Sie wurden daher als eine Gruppe der hämolytischen Gruppe gegenübergestellt. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, liegt ihr Quotient $B_{D/G}$ mit $0,58 \pm 0,178$ SD signifikant höher als bei der Hämolysegruppe mit $0,45 \pm 0,242$ SD. Dies steht in Übereinstimmung mit den einzigen Studien, die einen solchen Unterschied zwischen den erwähnten Patientengruppen belegen (41,43). Angaben in der Literatur schwanken, was den Quotienten $B_{D/G}$ betrifft, zwischen weniger als 0,15 (39,43) und Werten ähnlich denen, die in dieser Studie beobachtet wurden (41). Dies scheint die übliche Lehrbuchmeinung zum Bilirubinmetabolismus und dessen Störungen zu stützen (1,11,13,19,23,37). Danach wird Bilirubin im Blut an Albumin gebunden, durch die Leberzellmembran mittels eines spezifischen Transporters geschleust und dort in der Zelle mit Hilfe der UDP-Glykosid-Transferase mit zwei Molekülen Glucuronsäure gekoppelt und damit wasserlöslich und ausscheidungsfähig gemacht.

Folglich sollen sich eine prähepatische sowie eine Leberzellaufnahme- und Konjugationsstörung in einem Anstieg des indirekten, eine intrahepatische postkonjugations- wie eine posthepatische Störung aber im Anstieg des direkten Bilirubins manifestieren. Wie unten weiter ausgeführt wird, ist aber sowohl der Aufnahme- als auch der Konjugationsmechanismus wenig störanfällig.

Die Tatsache, daß sich ein Parameter zwischen zwei Gruppen signifikant unterscheidet, sagt nichts darüber aus, mit welcher Treffsicherheit aus der Kenntnis des Parameters im individuellen Fall auf die Zugehörigkeit zur einen oder anderen Gruppe geschlossen werden kann. So ist aus Abbildung 1 ersichtlich, wie sehr sich die Werte der zwei Gruppen hinsichtlich des Verhältnisses des direkten zum Gesamtbilirubin überlappen. Eine klinisch brauchbare Treffsicherheit aufgrund der Bilirubinfraktionierung wurde noch nicht gezeigt, obwohl die Lehrbücher die Fraktionierung empfehlen. Wie oben geschildert, wird dazu der parametrische Wert $B_{D/G}$ in eine Alternativenentscheidung hämolytisch/hepatobiliär umgewandelt. Dazu verwendet man die ROC-Kurve. Mit dem optimalen Grenzwert erhält man die größte Ausbeute korrekter Entscheidungen. Ein solcher wurde in der Literatur bis jetzt noch nicht mitgeteilt. Es ergab sich ein optimaler Grenzwert von 0,33 (s. Abbildung 2). Die hier erzielte Quote richtig zugeordneter Fälle beträgt 91 % für hepatobiliäre und nur 55 % für hämolytische Erkrankungen, was ein sehr ungenaues Ergebnis ist. Nach allgemeiner Ansicht ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt des Bilirubinmetabolismus die anscheinend an eine ATPase gebundene Exkretion des konjugierten Bilirubins aus den Hepatocyten in die Gallencanaliculi (6,8,16). Man schließt dies daraus, daß größere Leberzellschäden bei Leberkrankheiten vorkommen, ohne daß Aufnahme und Konjugation gestört

wären (7,16,34), desgleichen, daß Hämolysen von bis zu 50 % des Blutvolumens vorkamen, ohne daß die Zellaufnahme gestört worden wäre (31). Bei einem Serum-bilirubin über 3 mg% steigt jedenfalls auch ohne Vorliegen eines Leberzellschadens der Anteil des direkten Bilirubins (11), d.h. es scheint hier die Sekretionsfähigkeit überschritten zu werden und es kommt zu Rückstau und Regurgitation ins Serum bei weiterhin funktionierender Konjugation. In der zweiten ROC-Kurve mit einem maximalen Gesamtbilirubin von 3 mg% betrug die Sensitivität des Tests nun für hepatobiliäre Erkrankungen 86 %, für Hämolyse 80 %. Wiederum wurden insgesamt - wie bei der Auswertung aller Patientendaten unabhängig von der Höhe des Gesamtbilirubin - 84 % der Fälle richtig klassifiziert.

Sind die erzielten Sensitivitäten und Spezifitäten nun hinreichend, um einen differentialdiagnostischen Wert zu beanspruchen?

Zur Beantwortung dieser Frage müssen sie mit den a-priori-Wahrscheinlichkeiten verglichen werden, die für das Vorliegen der einen oder anderen Ikterusgenese aufgrund der Häufigkeitsverteilung am untersuchten Kollektiv bestehen. Für die Hämolyse beträgt diese a-priori-Wahrscheinlichkeit 22 % (20 von 92 Patienten), nach Beschränkung auf niedrige Bilirubinwerte 26 % (10 von 38 Patienten); für die hepatobiliären Erkrankungen 78 % bzw. 74 %. Die Bilirubinfraktionierung erhöht daher die Wahrscheinlichkeit, daß ein Patient mit Hämolyse korrekt klassifiziert wird, von 22% auf 55 % bzw. von 26 % auf 80 % und damit entscheidend.

Patienten mit hepatobiliärer Erkrankung profitieren dagegen erheblich weniger, die Wahrscheinlichkeit wird von 78% auf 91% bzw. von 74% auf 86% erhöht.

Da hepatobiliäre Erkrankungen aber im allgemeinen

wesentlich leichter zu diagnostizieren sind als hämolytische, ist dieses schlechtere Abschneiden nicht sehr bedeutsam. In der Realität dürfte der diagnostische Gewinn bezüglich der Hämolyse eher noch höher liegen als es in dieser Studie zum Ausdruck kommt. Im unselektierten Krankengut ist wahrscheinlich die relative Häufigkeit hämolytischer Erkrankungen wesentlich kleiner als im hier untersuchten Kollektiv. Diese Häufung ist zum Teil dadurch bedingt, daß viele Patienten mit Lebercirrhose wegen Bluttransfusionen ausgeschlossen wurden, zum Teil durch das selektierte Krankengut einer Universitätsklinik.

Woran liegt es nun, daß die Bilirubinfraktionierung nicht so eindeutige Resultate liefert, wie man das durch die Kenntnis des Bilirubinmechanismus erwarten zu können glaubt ?

Zum einen dürfte es daran liegen, daß das Lehrbuchmodell einer doppelten Glucuronidierung zur Ausscheidung des Bilirubin unvollständig ist und erweitert werden muß: Es werden immer wieder neue Bilirubinverbindungen entdeckt, die das Bilirubin ausscheidungsfähig machen, so z.B. C_8 - und C_{12} -gekoppelte Monoglucuronide (36), sulfatgekoppeltes Bilirubin (6,16), ein direkt reagierendes proteingebundenes Deltabilirubin (26), sowie Glucose- und Xylosebilirubine (36,37). Inwieweit diese weiteren Bilirubinverbindungen von den kliniküblichen Assays als direktes Bilirubin erfasst werden, ist unklar (26). Damit erheben sich Zweifel, ob die Gleichsetzung von konjugiertem Bilirubin mit diglucuronidiertem Bilirubin korrekt ist und ob dieses alles als direktes Bilirubin erfasst wird.

Weiterhin dürfte auch die Ungenauigkeit der Meßmethoden differentialdiagnostische Entscheidungen aufgrund der Fraktionierung erschweren. Wechselnde Anteile des nicht gekoppelten Bilirubins werden als "direktes" Bilirubin gemessen (25,26,36,39). Auch ist die Korrelation zwischen direktem Bilirubin und der chromatographisch bestimmten Konzentration an Bilirubinkonjugaten nicht sehr gut (36). Generell scheinen die Diazoreaktionen nicht spezifisch genug zu sein (9,36). Eine der möglichen Erklärungen glaubt Blanckaert (10) gefunden zu haben: Er fand ein direktes (!) Bilirubin, das kovalent an Albumin gebunden ist, ein Komplex, der mit dem Diazoreagenz reagiert. Das kann die Diskrepanz der Resultate der üblichen Diazoverfahren hinsichtlich der Werte von Gesamtbilirubin im Vergleich zu spezifischeren Verfahren, bei denen Proteine denaturiert werden, erklären helfen. Weiter wird die Jendrassik-Grof-Methode durch die Hämolyse selbst und die Bildung von Met-Hämoglobin (wechselnde Konzentrationen z.B. bei Rauchern) beeinflusst.

Es darf auch nicht übersehen werden, daß die Unterscheidung zwischen direkt und indirekt reagierendem Bilirubin von der angesetzten Reaktionszeit abhängig ist. Je länger man die Reaktion mit dem Diazoreagenz laufen läßt, desto größere Anteile des Bilirubins reagieren ohne Akzeleratorzusatz (15,41). Das spielt allerdings nur dann eine Rolle, wenn man verschiedene Kits mit unterschiedlichen Reaktionszeiten vergleicht. Da man annehmen darf, daß jede Klinik nur eine Methode, einen Kit verwendet, und daß diese in der BRD einheitlich sind, ist dieser Punkt nur dann im klinischen Alltag wichtig, wenn z.B. bei den manuellen Methoden die Reaktionszeiten nicht exakt eingehalten werden.

Eine weitere Fehlermöglichkeit liegt darin, daß bei dem Ausscheidungsmechanismus in die Gallencanaliculi diverse Stoffe untereinander konkurrieren, die, teils endogen (organische Anionen, anabole Steroide), teils iatrogen (BSP, Jodkontrastmittel, Indocyaningrün) verursacht dann individuell verschiedene Meßergebnisse bieten (6, 8,). Auch bei der Albuminbindung im Serum treten bekanntlich viele Medikamente und auch körpereigene Stoffe in Konkurrenz (z. B. Cumarine, Östrogene, verschiedene Medikamente). Daraus können sich natürlich -unabhängig vom der zugrunde liegenden Krankheit -zeitliche und stoffliche Änderungen des Bilirubinmetabolismus und damit falsche Resultate ergeben.

Technische Störfaktoren sollen auch bei verschiedenen Analysenautomaten aufzufinden sein (13, 15, 23) , die allerdings für die Bestimmung des direkten Bilirubins in unserer Klinik nicht verwendet wurden. Meßungenauigkeiten aller Methoden bestehen im normalen Konzentrationsbereich (5, 13, 23, 39) des Bilirubins ($B_G < 1 \text{ mg\%}$, $B_D < 0,3 \text{ mg\%}$), der in dieser Studie nicht berücksichtigt wurde.

Aus all den genannten Fehlermöglichkeiten ergibt sich, daß die Lehrbuchmeinung, daß prähepatische, Leberzell- aufnahme- wie Konjugationsstörungen einen Anstieg des ungekoppelten, indirekten Bilirubins nach sich ziehen, dagegen Ausscheidungs- und posthepatische, obstruktive Störungen einen solchen des direkten Bilirubins zwar "logisch" ist, in der Praxis aber so klar nicht zutrifft. So kommt es zu unklaren Sachverhalten, wie sie wie folgt in der Literatur beschrieben werden:

Anstieg des direkten Bilirubins bei starker Hämolyse ohne Leberzellschaden (11,34), Anstieg des indirekten Bilirubins bei Lebercirrhose (17,33), bei chronischer Hepatitis (29), bei einer Menge weiterer ganz unterschiedlicher Krankheiten (25). Dazu kommt noch, daß bei vielen Leberkrankheiten die Lebensdauer der Erythrocyten erniedrigt ist (30), so daß z.B. bei viraler Hepatitis Hämolyse beobachtet wurde (35). Da man also meist andere, spezifischere Tests anwenden muß, um zu einer klaren Diagnose zu kommen, ist die Fraktionierung von beschränktem Wert. Für Lebererkrankungen sind diese anderen Untersuchungen viel spezifischer (Klinik, GOT, GPT, Gamma-GT, Sonographie) als die Bilirubinmessung. Bei der Hämolyse gibt es allerdings nur wenige und zudem nur ungenaue Parameter: Der Haptoglobinspiegel, der nur bei intravasaler Hämolyse abfällt, aber bei allen möglichen Entzündungen und Tumoren ansteigt (42), die Retikulozytenzahl, die aber nur bei massiver Hämolyse merklich ansteigt, die sehr unspezifische, weil in vielen Organen vorhandene LDH, das Serumhämoglobin, das aber in Abwesenheit von Haptoglobin teils von parenchymatösen Organen aufgenommen, teils durch die Nieren ausgeschieden wird. Nur für wenige Hämolysearten gibt es auch noch spezifischere Tests wie z.B. den Sucrosetest bei Marchiafava-Syndrom. Aus allen genannten Umständen ergibt sich, daß es bei Bilirubinerhöhung im Serum sinnvoll ist, erst einmal von einer hepatobiliären Krankheit auszugehen. Nur wenn man in dieser Richtung nicht fündig wird, lohnt es sich eventuell, unter der Vermutung einer Hämolyse o.a. die Bilirubinfraktionierung vorzunehmen. Da hepatobiliäre Erkrankungen aber im klinischen Krankengut bei weitem häufiger auftauchen als reine Hämolysen, ist unter diesem Aspekt die Fraktionierung nur selten zu empfehlen.

Eine Hilfe bieten kann die Fraktionierung möglicherweise bei der Unterscheidung der sogenannten "funktionellen Hyperbilirubinämien" untereinander. Diese sind die angeborenen Leberschwächen mit einem Mangel an Glucuronyl-Transferase, die u.a. die Konjugation bewerkstelligt, einerseits (Morbus Gilbert-Meulengracht, Morbus Crijgler-Najjar) und mit Exkretionsschwäche andererseits (Rotor- bzw. Dubin-Johnson-Syndrom). Ersteres soll zum Anstieg des indirekten, letzteres zum Anstieg des direkten Bilirubins führen. Zur Kritik läßt sich sagen, daß alle diese Erkrankungen klinisch Ausschußdiagnosen sind und keinesfalls durch die Bilirubinfraktionierung grundsätzlich diagnostiziert werden. Weiter läßt sich der Mangel an Glucuronyl-Transferase durch das Argument der Existenz weiterer Bilirubinverbindungen zur Ausscheidung relativieren. Die Exkretionsschwäche der Leber läßt sich auch nicht durch die Bilirubinfraktionierung feststellen, weil das biochemische Korrelat des Exkretionsmechanismus nicht bekannt ist, und bei diesem eine Vielzahl von Stoffen und Körperstörungen Einfluß nimmt: Die Exkretion ist auch gestört bei Virus- und Alkoholhepatitis, Cirrhose, bei Schwangerschaftsiktikus und bei vielen Medikamenten, z.B. Steroide, Testosteron, Chlorpromazin u.a. Inwieweit also die Unterscheidung dieser Hyperbilirubinämien bei genauerer Bestimmung aller Bilirubinverbindungen möglich ist, sei dahingestellt und ist nicht Gegenstand dieser Studie.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird untersucht, ob die in der Klinikroutine übliche Fraktionierung des Serumbilirubins in eine direkt und in eine indirekt reagierende Fraktion in qualitativer wie in quantitativer Hinsicht genügend Aussagekraft besitzt, um hämolytische von hepatobiliären Erkrankungen zu trennen. Es wurden die Daten von 92 Patienten aus 5 Erkrankungsgruppen verglichen, wobei wegen des gleichen Bilirubinverhaltens 4 dieser 5 Gruppen zur hepatobiliären Gruppe zusammengeschlossen und der hämolytischen Gruppe gegenübergestellt wurden. Die Spezifität und die Präzision der getrennten Bilirubinbestimmung wurde geprüft. An Hand einer ROC-Kurve wurde dann untersucht, mit welchem Prozentsatz die jeweilige Gruppe richtig-positiv und richtig-negativ erfasst wurde und bei welchem Bilirubinwert die Trennung in diese zwei Gruppen am klarsten ausfiel. Dieser optimale Grenzwert wurde bei einem Verhältnis des direkten zum Gesamtbilirubin von 0,3 gefunden, wobei dennoch der Prozentsatz der richtig-positiv erfassten Werte der Hämolysegruppe schlecht war. Eine weitere ROC-Kurve mit Werten von maximal 3 mg% Serumbilirubin ergab bei praktisch gleichem Grenzwert eine Verbesserung der Sensitivität der Hämolysegruppe bei leichter Verschlechterung der Sensitivität der hepatobiliären Gruppe. Aus Grund der nicht befriedigenden Trennungsfähigkeit, der ungenügenden Exaktheit des Bestimmungsverfahrens, dem Vorhandensein spezifischerer Tests und des weitaus häufigeren Auftretens hepatobiliärer Erkrankungen im Klinikalltag erscheint die fraktionierte Bilirubinbestimmung bei Erwachsenen entbehrlich.

- 1 Amman R :Ikterus,in:Differentialdiagnose innerer Krankheiten.W.Siegenthaler;Thieme,Stuttgart, New York (1980), 23.1 - 25.36
- 2 Angehrn FG,Schmid F,Iescia R,Horica CA,Koelz HK,Herz R, Cueni B,Schmid M,Akovbiantz A,Heinzel F,landolt M, Haemmerli UK,Blum AL: Lebermetastasen:Diagnostischer Wert von Bluttests,Szintigraphie und Laparoskopie.Dtsch med Wschr 101 (1976) 1047-1055
- 3 Becker K, Internistische Welt 4/1983
- 4 Bergh v d AAH,Muller P : Über eine direkte und indirekte Diazoreaktion auf Bilirubin, Biochem Z 1916 (S.90 ff)
- 5 Berk PD,Howe RB,Bloomer JR,Berlin N :Studies of bilirubin kinetics in normal adults. J Clin Invest 48 :2176 (1969)
- 6 Billing BH: Bilirubin metabolism in: Schiff,Disease of the liver,Lipincott Co 1975,S.292 ff
- 7 Black M,Billing BH: Hepatic Bilirubin UDP-glucuronyl transferase activity in liver disease and Gilbert's syndrome. New Eng J Med 280 (1971) 1266
- 8 Blanckaert N,Schmid R: Physiology and Pathophysiology of Bilirubin Metabolism in : "Hepatology" von Zakim D/ Boyer T, WB Saunders Co,Philadelphia/London/Toronto 1982,S.246 ff.
- 9 Blanckaert N: Analysis of bilirubin and bilirubin mono-and diconjugates.Determination of their relative amounts in biological samples.Biochem.J. 183 (1979) 115
- 10 Blanckaert N, D'Argenio G :Presence of bilirubins linked covalently to albumin in serum of patients with cholestasis (Abstract).Gastroenterology 82 (1982) 1222
- 11 Bloomer JR,Berk PD,Howe RB,Berlin NI :Interpretation of plasma bilirubin levels based on studies with radioactive bilirubin .JAMA 218 (1971) 216

- 12 Brown SS, Mitchell FL, Young LS :Chemical diagnosis of
disease. Elsevier, Amsterdam 1979, 537-540
- 13 Chu SY, Kaczmarek A, Turkington VE :A "one-minute" direct
bilirubin determination using the Abbott ABA-100 bi-
chromatic analyzer. Clin Biochem 15 (1982) 113
- 14 Combes B, Schenker S :Laboratory Tests. In: Diseases of the
liver. L. Schiff, Lipincott Philadelphia/Toronto 1975, 204-246
- 15 Dumas BT, Perry BW, Jendrzejjczak B, Katona V :Pitfalls in
the American Monitor Kit methods for determination of
total and "direct" bilirubin. Clin Chem 28/11 (1982) 2305
- 16 Fevery JF, Groote de J: Störungen und Diagnostik des Gallen-
farbstoffwechsels. In: Klinische Hepatologie. Kühn HA,
Wernze H, Thieme, Stuttgart 1979, 3.2-3.21
- 17 Fevery J, Claes J, Heirwegh K, de Groote J :Hyperbilirubinemia:
Significance of the ratio between direct-reacting and total
bilirubin. Clin Chim Acta (1967) 73
- 18 Gambino SR, Other A, Burns W :Direct Serum bilirubin and the
Sulfobromophthalein Test in Occult Liver Disease. JAMA 201
(1967) 171
- 19 Gambino SR, Re JJ :Manual of bilirubin assay, Commission
on Continuing Education of ASCP, Chicago 1963
- 20 Haefter E: Praktische Gastroenterologie. Thieme, Stuttgart 1978
S. 490 ff
- 21 Immich H: Med. Statistik, Schattauer 1974, S. 323 ff
- 22 Jendrassik L, Grof I: Vereinfachte photometrische Methoden
zur Bestimmung des Bilirubin. Biochem Z 297 (1938) 81
- 23 Killenberg IG, Stevens RL, Wildermann RF, Wildermann NM: The
laboratory method as a variable in the interpretation of
serum bilirubin fractionation. Gastroenterology 78 (1980) 1011

- 24 Kühn HA: Pathogenese und Differentialdiagnose der Gelbsucht. In: Klin. Hepatologie, Kühn HA, Wernze H; Thieme, Stuttgart 1979, 5.7-5.21
- 25 Levine RA, Klatskin G: Unconjugated hyperbilirubinemia in the absence of overt hemolysis. Am J Med 36 (1964) 541
- 26 Lo BL, Wu TW: Assessment of the fundamental accuracy of the Jendrassik-Grof total and direct bilirubin assays. Clin Chem 29 (1983) 31
- 27 Lusted LB: Decision making studies in patient management. New Engl J Med 284 (1971) 416
- 28 Mc Neil B, Keeler E, Adelstein SJ: Primer on certain elements of medical decision making. New Engl J Med 293 (1975) 211
- 29 Perrault J: Unconjugated hyperbilirubinemia in Chronic Active Hepatitis in Children. Gastroenterology 77 (1979) 819.
- 30 Pitcher CS, Williams R: Reduced red cell survival in jaundice and its relation to abnormal glutathione metabolism. Clin Sci 24 (1963) 239
- 31 Powell LW: The assessment of red cell survival in idiopathic unconjugated hyperbilirubinemia (Gilbert's syndrome) by the use of radioactive diisopropylfluorophosphate and chromium. Aust Ann Med 16 (1969) 221
- 32 Sachs L: Angewandte Statistik, Springer 1978, S. 201 ff, S. 300 ff
- 33 Schaeffer J, Schiff L: Liver function tests in metastatic tumor of the liver: Study of 100 cases. Gastroenterology 49 (1965) 360

- 34 Schalm L, Weber APH :Jaundice with conjugated bilirubin in hyperhemolysis. *Acta Med Scand* 176 (1964)549
- 35 Scharschmidt BF :In: *Gastrointestinal Disease* . Sleisinger/Fordtran, 3rd ed, WB Saunders Co 1983
- 36 Scharschmidt BF, Blanckaert N, Farina FA, Kabra PM, Stafford BE, Weisinger RA: Measurement of serum bilirubin and its mono- and diconjugates: Application to patients with hepatobiliary disease. *GUT* 23 (1982)643
- 37 Schmid R :Bilirubin Metabolism: State of the Art. *Gastroenterology* 74 (1978) 1307
- 38 Shull BC, Lees H, Li PK :Mechanism of interference by hemoglobin in the determination of total bilirubin. II. Method of Jendrassik-Grof. *Clin Chem* 26(1980)26
- 39 Tisdale WA, Klatskin G, Kinsella ED :The significance of the direct-reacting fraction of serum bilirubin in hemolytic jaundice. *Am J Med* 26 (1959) 214
- 40 Wahlefeldt AW, Herz G :*Scand J clin Lab Invest* Vol 29 Suppl 126 (1972) Abstract 11.12
- 41 Watson CJ :The importance of the fractional serum bilirubin determination in clinical medicine. *Ann Int Med* 45 (1956) 351
- 42 White F; Degradation of hemoglobin. In: *Hematology*. Williams WJ, Beutler B, Erslev AJ, Rundles RW, 2nd ed, Mc Graw-Hill, New York 1972, S. 230 ff
- 43 Zieve L, Hill E, Hanson M, Falcone AB, Watson CJ :Normal and abnormal variations and clinical significance of the one-minute and total serum bilirubin determinations. *J Lab Clin Med* 38 (1951) 446

L e b e n s l a u f

Am 29. August 1955 wurde ich als zweites von vier Kindern des Chefarztes und Internisten Dr. med. Hans-Rudolf Presch und seiner Frau Renate in Bad Steben (Bayern) geboren. Von 1961 - 1965 besuchte ich die Volksschule Bad Steben, um dann auf den humanistischen Zweig des Jean-Paul Gymnasiums in Hof/Saale zu wechseln, wo ich 1974 mein Abitur machte. 1974 - 76 war ich in der Bundesluftwaffe tätig. Danach arbeitete ich als Krankenpfleger, bis ich 1978 einen Medizinstudienplatz erhielt. Von 1978 bis 1985 Studium der Medizin in Mainz, Ulm und München. Parallel dazu Studium der Jurisprudenz 1980-84. In dieser Zeit auch ständige Arbeit als Krankenpfleger sowie mehrere Auslandsfamulaturen. Approbation und Promotion im Frühjahr 1985.

